

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-135988

(43)Date of publication of application : 17.05.1994

(51)Int.Cl.

C07H 19/067

C07H 19/073

(21)Application number : 04-308094

(71)Applicant : TOAGOSEI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 22.10.1992

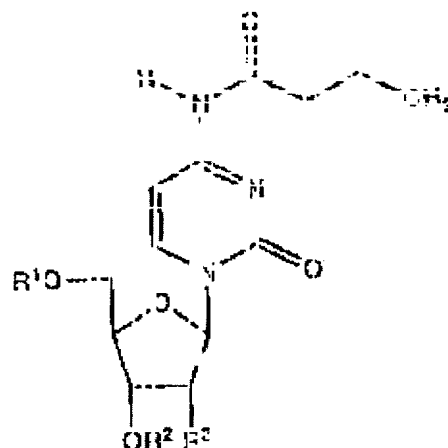
(72)Inventor : HORIE YOUJI  
YOSHIDA MASAO

## (54) NUCLEOTIDE DERIVATIVE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a novel compound useful for the chemical synthesis of oligonucleotides, facilitating protecting group removing reactions, exhibiting proper stability also during basic treatments performed in the synthetic reaction operations, and capable of being readily purified.

CONSTITUTION: A compound of the formula (R1 is H, trityl, alkoxytrityl, n-butyl; R2 is H; R3 is H, OH), e.g. 5'-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-N4-(n-butyl)-2'-deoxycytidine. The compound of the formula is produced e.g. by protecting the 3',5'-hydroxyl groups of 2'-deoxycytidine with trimethylsilyl chloride, reacting the protected product with n-butyl chloride, selectively removing the protecting groups of the 3',5'-hydroxyl groups with ammonia water, reacting the obtained intermediate product with 4,4'-dimethoxytrityl chloride without purifying the intermediate product, and finally removing the n-butyl group from the produced protected nucleotide having the n-butyl group as the protecting group of the amino group on the outside of the ring.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-135988

(43)公開日 平成 6 年(1994) 5 月17日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 0 7 H 19/067  
19/073

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 4 頁)

(21)出願番号 特願平4-308094

(22)出願日 平成 4 年(1992)10月22日

(71)出願人 000003034

東亜合成化学工業株式会社

東京都港区西新橋 1 丁目14番 1 号

(72)発明者 堀江 洋慈

茨城県つくば市大久保 2 番東亜合成化学工  
業株式会社つくば研究所内

(72)発明者 吉田 ▲祇▼生

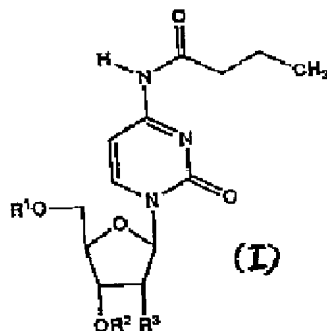
茨城県つくば市大久保 2 番東亜合成化学工  
業株式会社つくば研究所内

(54)【発明の名称】 ヌクレオシド誘導体

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 オリゴヌクレオチドの化学的合成において有用性を有し生化学の分野で広く利用される、ヌクレオシド誘導体を提供する。

【構成】 シトシンのアミノ基がn-ブチリル基で保護されている式 (I) のヌクレオシド誘導体。



〔式中、R<sup>1</sup> はH、トリチル基、アルコキシトリチル基またはn-ブチリル基を；R<sup>2</sup> はH；R<sup>3</sup> はHまたはOHを表わす。〕

【効果】 ヌクレオシド誘導体は、その3'-水酸基と

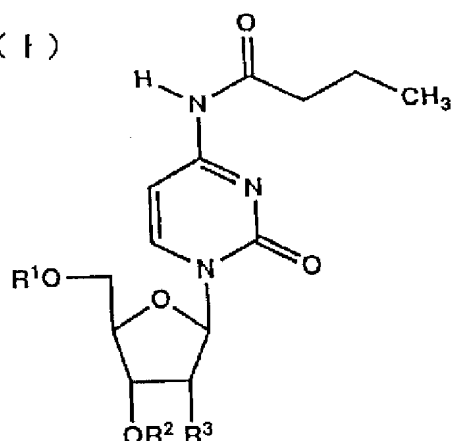
各種リン酸化剤を作用させることにより、オリゴヌクレオチド合成用のモノヌクレオチドユニットを合成することが可能であり、コハク酸無水物と作用させカルボキシル基を導入し、更に、反応基を有する固相単体と縮合反応を行い、ヌクレオシド担持サポートを合成することもできるうえに脱保護も容易である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の式(1)で示されるヌクレオシド誘導体。

## 【化1】

式(1)



但し式中、 $R^1$  は水素原子、トリチル基、アルコキシトリチル基または $n$ -ブチル基を表わし、 $R^2$  は水素原子、 $R^3$  は水素原子または水酸基を表わす。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規なヌクレオシド誘導体に関するもので、本発明のヌクレオシド誘導体は、オリゴヌクレオチドの化学的合成において有用性を有し生化学の分野で広く利用されるものである。

## 【0002】

【従来の技術】化学的にオリゴヌクレオチドを合成する方法としては、モノヌクレオチドユニットの糖部分の3'、5'水酸基の縮合反応を経てリン酸エステル結合を生成させる方法がとられている。この合成方法は、モノヌクレオチドユニットに何を用いるかによって大きく3種類に大別されるが、いずれの方法においても、5'あるいは3'水酸基から誘導されたリン酸部分と他方の水酸基のみを縮合反応に関与させ、それ以外の反応性基をこの縮合反応に関与させずに行わねばならない方法である。従って、使用する核酸塩基（プリンまたはピリミジン）が有するアミノ基、イミノ基、ケト基、水酸基等には保護基を導入して反応への関与を防止し、全縮合反応終了の後、縮合反応生成物中の保護基を脱離させる（脱保護する）ことにより目的の配列を有するオリゴヌクレオチドを得る方法がとられている。この際に用いられる核酸塩基の環外アミノ基の保護基としては、具体的には核酸塩基がアデニンまたはシトシンの場合はベンゾイル基、 $p$ -アニソイル基もしくはフェノキシアセチル基が、また核酸塩基がグアニンであるときはイソブチル基等が挙げられ、これらの保護基を脱離させる方法、すなわち脱保護法としては、濃アンモニア水を55℃において、8-15時間作用させるという方法が一般的であ

る。

【0003】現在採用されている以上のような保護基の除去法は、長時間を要することに加えて、縮合反応生成物が塩基性条件下に長時間暴露されることによる、インターヌクレオチド結合切断等の副反応を伴い、目的物の単離収量の低下を招くという欠点を有しているものである。この為、より温和な条件で容易に除去できる保護基の開発が検討され、種々の保護基がこれまでに開発されている。それらの中でもアデニンまたはグアニンに対するフェノキシアセチル基またはジメチルホルムアミジン基、シトシンに対するイソブチル基が特に優れているとされている。その中で、シトシンの環外アミノ基の保護基としてイソブチル基の利用は盛んに行われているが、2'-デオキシシチジンを出発物質とし保護基を導入する反応の収率は2段階で45%程度（Schulhof J. C. et. al., Nucleic Acids Res., 1987, 15, 397）と低い。さらに、核酸合成に用いられる他の保護基（例えばフェノキシアセチル基等）と比べ、イソブチル基の脱保護速度のみが遅く、温和な条件（例えば室温下）を要求される場合、それに応じられないという欠点を有している。また、アミジン化モノヌクレオチド類は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製ができないため、再沈澱法による精製のみが可能と報告されているが（Zemlicka J. et. al., Collect. Czech. Chem. Commun., 1966, 31, 3198 ; McBride L. J. et. al., J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, 2040 等）、モノヌクレオチド類は、固有の結晶形を殆ど有しないため、この精製法では不純物の混入が起こり易く、再現性も低く、大量の有機溶媒を要することも大きな問題として存在する。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、合成収率の向上を可能とし、温和な条件での保護基の除去が可能で副生成物の生成が少なく、精製も容易なヌクレオシド誘導体の提供、すなわち、従来よりも脱保護が容易に完了し、且つ合成反応操作中にしばしば用いられる塩基処理中にも適度の安定性を有し、精製も容易なヌクレオシド誘導体の提供にある。

## 【0005】

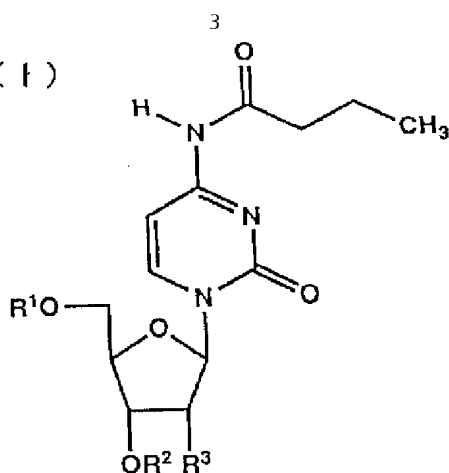
【課題を解決するための手段】本願発明者らは、シトシン-アミノ基の保護基としての $n$ -ブチル基が上記の要求に応えるものであることを見出し、本発明を完成したのである。

【0006】すなわち、本発明は、下式(1)で表わされるヌクレオシド誘導体に関するものである。

## 【0007】

## 【化2】

式(1)



【0008】但し式中、 $R^1$  は水素原子、トリチル基、アルコキシトリチル基または $n$ -ブチリル基を表わし、 $R^2$  は水素原子、 $R^3$  は水素原子または水酸基を表わす。

#### 【0009】〇ヌクレオシド誘導体

本発明のヌクレオシド誘導体は、前記式(1)で表わされるものであって、シトシンのアミノ基が $n$ -ブチリル基で保護されている点に最大の特徴を有するものである。前記式(1)における $R^1$ のアルコキシトリチル基としては、低級アルコキシトリチル基、特にメトキシトリチル基、さらに具体的には4-メトキシトリチル基、4,4'-ジメトキシトリチル基等を挙げることができる。

#### 【0010】〇合成方法

本発明のヌクレオシド誘導体は、従来公知の方法で合成し得るが、前記式(1)における $R^1, R^2, R^3$ が水素原子であるアミノ保護体を、いわゆる *in situ* で合成した後、これを精製することなく次の反応に用いて合成することができ、その点も本発明が有する特長の一つである。即ち、Jones 等の方法(J. Am. Chem. Soc., 1982, 104, 1316)に従い、3',5'-トリメチルシリル体、次いで3',5'-トリメチルシリル化アミノ基保護体を合成した後、適当な方法で脱トリメチルシリル化を行い、得られたアミノ基保護ヌクレオシドを精製しないで次のトリチル化反応に用いるものである。この方法によれば、アミノ基保護誘導体等の中間体を単離、精製するための手間を省くことができるだけでなく、その過程で生ずる目的物の損失を最小限に抑えることができる。例えば本発明の1つの目的物である5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)- $N^4$ -( $n$ -ブチリル)-2'-デオキシシチジン( $R^1 = 4,4'$ -ジメトキシトリチル、 $R^2, R^3 =$ 水素原子)は、2'-デオキシシチジンを出発物質とし、3',5'水酸基にトリメチルシリルクロリドによる中間保護を施した後、 $n$ -ブチリルクロリドを作用させ、少量の水で反応を停止した後、アンモニア水で3',5'水酸基の保護基を選択的に除去し、中間生成物( $R^1, R^2, R^3 =$ 水素

4

原子)を得る。この一連の合成は、中間生成物( $R^1, R^2, R^3 =$ 水素原子)をカラムクロマトグラフィー等に分離、精製するだけで、更に精製等の操作を加えることなく、4,4'-ジメトキシトリチルクロリドを作用させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離、精製することにより、 $n$ -ブチリル基を環外アミノ基の保護基として有する保護ヌクレオシド( $R^1 = 4,4'$ -ジメトキシトリチル、 $R^2, R^3 =$ 水素原子)が全収率95%で得られる。得られた保護ヌクレオシド( $R^1 = 4,4'$ -ジメトキシトリチル、 $R^2, R^3 =$ 水素原子)を、各種塩基性条件下、脱保護反応を行ったところ、容易に脱保護が完了した。例えば、室温下、過剰量の30%アンモニア水/ピリジン=1/1で6時間、同2/1で1.5時間で脱保護が完了した。

#### 【0011】

【作用】本発明のアミノ基の保護基として $n$ -ブチリル基を有する誘導体は、理由は不明であるが合成時の副生成物の生成が少なく、著しく高い収率で合成することを可能にするとともに、アルカリによる脱保護が容易に進むという画期的な作用を示すものである。

#### 【0012】

#### 【実施例】

##### 実施例1

2'-デオキシシチジンモノ塩酸塩(0.53g、2mmol)をピリジン(5ml)で2回共沸し、アルゴン雰囲気下、室温にて乾燥ピリジン(10ml)を加え攪拌した。この懸濁液にトリメチルシリルクロリド(1.23ml、10mmol)を加え30分間攪拌し、更に $n$ -ブチリルクロリド(0.25ml、2.4mmol)を加え90分攪拌した後水(1ml)を加え反応を停止し、1/2程度濃縮する。この溶液に氷浴中、28%アンモニア水(1ml)を加え10分間攪拌した。過剰のアンモニア水と溶媒を留去し、エタノールを加え、中間生成物( $R^1, R^2, R^3 =$ 水素原子)とピリジン塩酸塩を得た。この混合物を、ピリジン(5ml)で3回共沸し、アルゴン雰囲気下、室温にて、乾燥ピリジン(10ml)に溶解し、4,4'-ジメトキシトリチルクロリド(0.68g、2mmol)を加え2時間攪拌した。メタノール(2ml)を加え反応を停止し、溶媒を留去した。残査をクロロホルム(20ml)に溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水で中和した後、クロロホルムで抽出(20ml×3回)し、水で洗浄後無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、カラムクロマトグラフィーにて分離精製し、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)- $N^4$ -( $n$ -ブチリル)-2'-デオキシシチジンを1.00g得た(収率:2'-デオキシシチジンモノ塩酸塩に対して95%)。得られた5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)- $N^4$ -( $n$ -ブチリル)-2'-デオキシシチジンのNMRチャートのケミカルシフト、IRチャートの波数およびシリカゲル薄層クロマトグラフィーの移動度を以下に示す

$^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 9.00 (br s, 1H,

NH)

8.26 (s, 1H, 6H)

8.13 (s, 1H, 5H)

7.52-7.10 (m, 9H, ArH)

6.82 (d, J=9Hz, 4H, ArH)

6.29 (t, J=6Hz, 1H, 1'H)

4.69-4.38 (m, 1H, 3'H)

4.30-4.03 (m, 1H, 4'H)

3.81 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>)

3.57-3.30 (m, 2H, 5'H)

3.02-2.43 (m, 2H, 2'H)

2.37 (t, J=7Hz, 2H, COCH<sub>2</sub>)1.67 (sext, J=7Hz, 2H, CH<sub>2</sub>)0.94 (t, J=7Hz, 3H, CH<sub>3</sub>)IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3369.9 2962.9 1

720.7 1653.1

1560.6 1492.1 1392.7 1314.6

1251.9 1177.7 1094.7 1034.9

\* 828.5 790.9

シリカゲル薄層クロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH=10:1)

Rf: 0.42

【0013】

【発明の効果】本発明のヌクレオシド誘導体は、その3'-水酸基と各種リン酸化剤を作用させることにより、オリゴヌクレオチド合成用のモノヌクレオチドユニットを合成することが可能であり、コハク酸無水物と作用させカルボキシル基を導入し、更に、反応基を有する固相単体と縮合反応を行い、ヌクレオシド担持サポートを合成することもできるという優れた効果を奏するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で得られた本発明のヌクレオシド誘導体、5'-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-N'-(n-ブチリル)-2'-デオキシシチジンのIRチャートである。

【図1】

